

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 8 月 25 日 (25.08.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/078078 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 9/04,
B01D 15/04, 61/14, B01J 39/04, 49/00

東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株式会社 栄養科学
研究所内 Kanagawa (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/002356

(74) 代理人: 志賀 正武, 外 (SHIGA, Masatake et al.); 〒
104-8453 東京都中央区八重洲 2 丁目 3 番 1 号 Tokyo
(JP).

(22) 国際出願日: 2005 年 2 月 8 日 (08.02.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2004-39704 2004 年 2 月 17 日 (17.02.2004) JP

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 森永
乳業株式会社 (MORINAGA MILK INDUSTRY CO.,
LTD.) [JP/JP]; 〒108-8384 東京都港区芝五丁目 3 番
1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 市橋 信夫 (ICHI-
HASHI, Nobuo) [JP/JP]; 〒228-0004 神奈川県 座間市
東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株式会社 食品総合
研究所内 Kanagawa (JP). 山内 恒治 (YAMAUCHI, Koji)
[JP/JP]; 〒228-0004 神奈川県 座間市 東原五丁目 1 番
8 3 号 森永乳業株式会社 栄養科学研究所内 Kanagawa
(JP). 新光 一郎 (SHIN, Kouichirou) [JP/JP]; 〒228-0004
神奈川県 座間市 東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株
式会社 栄養科学研究所内 Kanagawa (JP). 安藤 哲也
(ANDO, Tetsuya) [JP/JP]; 〒228-0004 神奈川県 座間市

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING LACTOPEROXIDASE

(54) 発明の名称: ラクトパーオキシダーゼの製造方法

(57) Abstract: A process for producing lactoperoxidase, comprising the steps of (1) bringing a raw milk into contact with a cation exchanger having weakly acidic groups as ion exchange groups to thereby effect adsorption treatment; (2) washing the cation exchanger after the adsorption treatment; (3) bringing the cation exchanger after the washing into contact with a leaching solvent to thereby obtain a leaching solution having lactoperoxidase dissolved out into the leaching solvent; (4) concentrating the leaching solution through an ultrafiltration membrane to thereby effect deposition in the concentrated leaching solution; and (5) obtaining a lactoperoxidase solution by removing deposits from the concentrated leaching solution.

(57) 要約: (1)イオン交換基として弱酸性基を有する陽イオン交換体に乳原料を接触させて吸着処理する工程、(2)前記吸着処理の後の陽イオン交換体を洗浄処理する工程、(3)前記洗浄処理の後の陽イオン交換体に溶出溶媒を接触させ、該溶出溶媒中にラクトパーオキシダーゼが溶出された溶出液を得る工程、(4)前記溶出液を限外濾過膜で濃縮することにより、該濃縮された溶出液中に沈澱を生成させる工程、および(5)前記濃縮された溶出液から沈澱を除去してラクトパーオキシダーゼ溶液を得る工程を有する、ラクトパーオキシダーゼの製造方法。

WO 2005/078078 A1

1

明 細 書

ラクトパーオキシダーゼの製造方法

5

技術分野

本発明は、乳原料から高純度のラクトパーオキシダーゼを製造する方法に関する。本願は、2004年2月17日に出願された特願2004-039704号に対し優先権を主張し、その内容をここに援用する。

10

背景技術

ラクトパーオキシダーゼは、牛乳等の哺乳類の乳汁をはじめ、唾液、涙液、気道粘液等の分泌液に含有される酸化還元酵素である（例えば、アメリカン・ジャーナル・オブ・レスピラトリー・アンド・クリティカル・ケア・メディスン（American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine）、アメリカ、第166巻、2002年、p. S57～S61）。ラクトパーオキシダーゼは、分子量約8万の蛋白質である。ラクトパーオキシダーゼは、補酵素として一分子当り一つのヘムを含有している。このヘムの極大吸収波長は412nmに存在するため、高度に精製したラクトパーオキシダーゼは茶色を呈している（例えば、ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・ニュートリション（British Journal of Nutrition）、イギリス、第84巻、2000年、p. S19～S25）。

ラクトパーオキシダーゼには、抗菌性、抗ウイルス活性、抗酸化活性、抗がん作用、免疫調節作用等の多様な生物機能が報告されており（例えば、前記ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・ニュートリション（British Journal of Nutrition）、イギリス、第84巻、2000年、p. S19～S25、及びライフ・サイエンス（Life Sciences）、イギリス、第43巻、1988年、p. 739～745）、生体防御に関与する蛋白質として極めて重要であることが明らかにされている。このようなラクトパーオキシダーゼの産業上の利用に関して、既にヘリコ

2

バクタピロリ感染の治療用医薬を製造するためのラクトペルオキシダーゼ、ペルオキシドドナーおよびチオシアネートの使用（例えば、特表2000-509367号公報）、養殖水生動物の配合飼料に添加される病原菌感染予防及び治療剤（例えば、特許第3103615号公報）、老化防止剤（例えば、特許第3103167号公報）、肝機能改善剤（例えば、特開2001-226289号公報）、ペルオキシダーゼの予防および治療への応用（例えば、特表平6-501453号公報）、角膜障害治療剤（例えば、特許第2840795号公報）等に関する技術が開示されている。さらに、本出願人によってウレアーゼ不活性化組成物および飲食品（例えば、特開2002-238554号公報）および腸内フローラ改善剤および飲食品（例えば、特開2003-246753号公報）に関する技術が開示されている。

実験室規模でのラクトパーオキシダーゼの精製法に関しては、アクタ・ケミカ・スカンジナビカ (Acta Chemica Scandinavica)、デンマーク、第23巻、1969年、p. 171~184や、フェブス・レターズ (FEBS Letters)、オランダ、第110巻、1980年、p. 200~204や、ジャーナル・オブ・クロマトグラフィー (Journal of Chromatography)、オランダ、第795巻、1998年、p. 277~287にて報告されている。

その典型的な方法としては、塩酸等の酸を牛乳に添加してカゼインを等電点沈澱させ、上清であるホエーを調製する。得られたホエーを陽イオン交換体に接触させ、ホエー中で正に帯電しているラクトパーオキシダーゼを陽イオン交換体に吸着させる。次に陽イオン交換体を塩濃度の低い緩衝液で洗浄した後、塩濃度の高い緩衝液でラクトパーオキシダーゼを脱離させる方法が知られている。

実験室規模での精製法では、ラクトパーオキシダーゼの純度を高めるために、粒子径の小さなゲル状の陽イオン交換体を高密度に充填したカラムを用い、高圧ポンプで高速の通液を行う方法が一般的である（例えば、ジャーナル・オブ・クロマトグラフィー (Journal of Chromatography)、オランダ、第795巻、1998年、p. 277~287）。

これに対して、カラムに粒子径の比較的大きな陽イオン交換体を充填し、自然落下で通液を行う場合には、更に時間を要する（例えば、アクタ・ケミカ・スカ

ンジナビカ (Acta Chemica Scandinavica)、デンマーク、第 23 巻、1969 年、p. 171~184 やフェブス・レターズ (FEBS Letters)、オランダ、第 110 巻、1980 年、p. 200~204)。

5 近年の工業的規模における分離技術の進歩にともない、牛乳に含有される生理活性物質を高純度に分離・精製し、大量に製造することが可能になってきた。殆どの場合、実験室規模で最適化された蛋白質の精製法を、そのまま工業的規模にスケールアップする事は現実的には困難である。その要因として、実験室で汎用されるイオン交換体やカラムの特性が、必ずしも原料の大量処理には向いていないことが挙げられる。

10 また、乳原料への添加物の添加は、乳の風味および物性を変化させるので、乳原料からの蛋白質の精製には不都合である。さらに、陽イオン交換体の洗浄および陽イオン交換体からの蛋白質の脱離の目的で大量の添加物を使用した場合、精製された蛋白質からそれらの添加物を除去する必要があるため、製造法が複雑になる。

15 なお、乳原料からの高純度の蛋白質の製造における、これらの問題点を解決した製造法として、高純度牛ラクトフェリンの製造法（例えば、特公平 6-13560 号公報）が当出願人によって既に提案されている。

ラクトパーオキシダーゼの工業的な製造方法については以下のものが開示されている。

20 米国特許第 4667018 号の明細書では、牛乳およびその派生物からラクトフェリンやラクトパーオキシダーゼ等の蛋白質を精製する方法が開示されている。この方法では、陽イオン性の多糖類からなる陽イオン交換体に牛乳およびその派生物を接触させ、陽イオン交換体を低濃度の塩類溶液で洗浄した後、高濃度の塩類溶液で陽イオン交換体からの蛋白質の脱離を行う方法が公開されている。しか
25 しながら、この特許文献に記載の方法で製造される蛋白質は混合物として得られるため純度が高くなく、純度の高いラクトパーオキシダーゼの製造はできないという問題点を有していた。

特許第 2985158 号公報では、活性の高いラクテニン画分の回収方法が開示されている。この特許文献に記載の方法においても、ラクトパーオキシダーゼ

はラクテニンを構成する一成分として蛋白質の混合物に含まれた状態で得られるため、高純度のラクトパーオキシダーゼの製造は出来ないという問題点を有していた。

- 5 欧州特許第0518448号明細書では、乳中の蛋白質を単離する方法として、金属キレート担体を使用した方法が開示されている。この方法でも単離される蛋白質が免疫グロブリン、ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼから構成される混合物であるため、高純度のラクトパーオキシダーゼの製造は不可能であるという問題点を有していた。

- 10 特許第3403066号公報では、牛乳あるいは牛乳誘導物から細胞増殖因子あるいは1種または2種以上の細胞増殖因子を含む組成物を回収する方法が開示されているが、この方法で得られる組成物は混合物であることから、高純度のラクトパーオキシダーゼ製造法ではないという問題点を有していた。

- 15 特許第2710283号公報では、乳清からの金属蛋白質の選択的抽出法として、カルボキシル基またはスルホン酸基を備えたデキストランで被覆された無機多孔性粒子（シリカ粒子）に乳清を接触させる工程を有する方法が開示されている。この方法で製造されたラクトパーオキシダーゼの純度は高くても50%程度であり、高純度のラクトパーオキシダーゼを製造するためには、さらに別の工程によって精製度を高める必要があるという問題点を有していた。

- 20 特許第2553180号公報では、乳清からのラクトパーオキシダーゼおよびラクトフェリンの純粋な画分の抽出法が開示されている。この方法では、陽イオン交換体の容積変化によって起こる目詰まりの問題を解決する手段として、マイクロ濾過で処理した乳清が原料として使用されている。この方法には、乳清以外の乳原料が使用できないため、適応範囲が狭いという問題点を有していた。さらに、乳原料の前処理として、マイクロ濾過も必要とされており、製造工程が複雑である。また、陽イオン交換体には、強陽イオン交換体が使用されており、ラクトパーオキシダーゼおよびラクトフェリンは、それぞれ塩濃度の異なる緩衝液によって選択的に陽イオン交換体から脱離される。この方法では、陽イオン交換体の洗浄と、蛋白質の選択的脱離を可能にするため、用いる緩衝液のpHを調整する必要がある、かかる緩衝液を調製するためには多量の添加物を必要とする。ま
- 25

た、精製された蛋白質から添加物を除去する必要がある、さらに工程を複雑化させる要因となるというような様々な問題点を有していた。

5 特許第 2 6 8 6 8 3 1 号公報では、強陽イオン性のスルホン基を導入した多糖類アフィニティ担体を陽イオン交換体として使用した鉄結合性蛋白質の分離精製法が開示されている。この方法では、比較的高純度（純度 8 5 %）のラクトパーオキシダーゼが製造される。しかし、吸着処理後の陽イオン交換体の洗浄工程において、p H 5 以下に調整された緩衝液による洗浄処理が必須である。また、ラクトパーオキシダーゼおよびラクトフェリンの選択的脱離には、それぞれ塩濃度の異なる p H 5 以下の緩衝液が必要であった。

10 特開平 5 - 2 0 2 0 9 8 号公報では、乳原料からの生理活性物質の製造法として、スルホン基を持つ強陽イオン交換体と、カルボキシル基を持つ弱陽イオン交換体のどちらでも使用可能な技術が開示されている。しかしながら、この方法においても、やはり吸着処理後の陽イオン交換体の洗浄と、ラクトパーオキシダーゼの選択的脱離を可能にするために p H 5 以下の緩衝液が必要であるという問題点を有していた。

15 米国特許第 5 5 9 6 0 8 2 号公報では、乳および乳製品からのラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼの精製法が開示されている。この特許では、乳および乳製品を高流速で通液することを可能とするために、陽イオン交換体として、粒子径が大きく、物理的に安定性の高いゲルが使用されている。この方法においても、吸着処理後の陽イオン交換体の洗浄とラクトパーオキシダーゼの選択的脱離のためには、緩衝液の使用による p H の調整が必要であるという問題点を有していた。なお、この特許で製造されるラクトパーオキシダーゼはその純度に関する記述がないことから、高純度のラクトパーオキシダーゼの製造が可能であるかどうかについては不明である。

25 上述のように、従来のラクトパーオキシダーゼの製造方法のほとんどにおいては、乳原料から回収されたラクトパーオキシダーゼは他の蛋白質との混合物として得られ、その純度は十分に高いとは言えなかった。また、ラクトパーオキシダーゼの純度を高めるためには、別の精製工程が必要であり、そのための時間と製造コストが必要であった。

また、ラクトパーオキシダーゼの純度が比較的高くなる製造方法であっても、乳原料に含まれるラクトパーオキシダーゼの選択的吸着、陽イオン交換体の洗浄、蛋白質の選択的脱離等を行うために、各工程でpHを調整する必要があり、これによって多量の添加物の使用が必要であるという問題点も含まれていた。

5

発明の開示

本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、イオン交換法と限外濾過膜法を用いた処理工程を行うことにより、製造工程全体をとおしてpH調整を行わなくても、乳原料から直接、高純度のラクトパーオキシダーゼを工業的に製造できる方法を見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明のラクトパーオキシダーゼの製造方法は、(1) イオン交換基として弱酸性基を有する陽イオン交換体に乳原料を接触させて吸着処理する工程、(2) 前記吸着処理の後の陽イオン交換体を洗浄処理する工程、(3) 前記洗浄処理された陽イオン交換体にラクトパーオキシダーゼを溶出させる溶出溶媒を接触させ、該溶出溶媒中にラクトパーオキシダーゼが溶出された溶出液を得る工程、(4) 前記溶出液を限外濾過膜で濃縮することにより、濃縮された溶出液中に沈澱を生成させる工程、および(5) 前記濃縮された溶出液から沈澱を除去してラクトパーオキシダーゼ溶液を得る工程、とを有するラクトパーオキシダーゼの製造方法である。

20

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の好ましい実施態様について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の好ましい実施態様に限定されず、本発明の範囲内で自由に変更することができるものである。

25 本発明は従来技術など問題や事情に鑑みてなされたものである。本発明は、添加物の使用による乳原料の組成および品質の変化を防止しつつ、従来より簡単な工程で、より短時間に、より低コストで、純度の高いラクトパーオキシダーゼを製造することができ、また工業的規模での製造にも適用することができる、ラクトパーオキシダーゼの製造方法を提供することを目的とする。

本発明における好ましい条件や得られる効果を以下に記載する。

本発明において、未加熱の脱脂乳 1 k g 中に前記陽イオン交換体 1 0 m l を投入したときのラクトフェリン吸着能は 8 5 m g / 1 0 m l 以上であることが好ましい。

5 前記イオン交換基はカルボキシメチル基であることが好ましい。

前記（４）工程において、溶出液中の蛋白質含有量は 0. 9 ～ 1 5 % となるように濃縮して沈澱を生成させることが好ましい。

前記（３）工程で用いる溶出溶媒のイオン強度は 0. 0 7 ～ 0. 3 であることが好ましい。

10 前記（３）工程で用いる溶出溶媒は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、および塩化マグネシウムからなる塩類群から選ばれる少なくとも 1 種を含む水溶液であることが好ましい。

さらに、前記（５）工程で得られたラクトパーオキシダーゼ溶液の溶媒を除去することにより固体状のラクトパーオキシダーゼを得る工程を有することが好ましい。
15

前記の工程で得られる固体状のラクトパーオキシダーゼの純度は 8 0 % 以上であることが好ましい。

本発明にあつては、陽イオン交換体に吸着されたラクトパーオキシダーゼを溶出溶媒中に溶出させる際には、ラクトパーオキシダーゼを他の画分（不純物）と
20 混合された状態で得、この後、限外濾過膜を用いて濃縮する際に、溶解度の差異によって他の画分（不純物）を選択的に分離・除去する。このことによって高純度のラクトパーオキシダーゼを得ることができる。

したがって、本発明によれば、以下のような効果が得られる。

（１） p H 調整を必要とする工程を経ずにラクトパーオキシダーゼを選択的に回収することができる。
25

（２）簡単な工程により、より短時間に、より低コストで高純度のラクトパーオキシダーゼを製造することができる。

（３）緩衝液や多量の添加物を必要としないことから、低コスト化の点で有利である。

(4) 添加物の使用による乳原料の組成および品質の変化を防止することができる。

(5) 工業的スケールに容易に適用することができる。

(6) 陽イオン交換体に接触させる原料として乳清以外の乳原料も広く適用することができる。

次に、本発明の好ましい実施態様についてさらに詳細に説明する。

なお、本明細書における蛋白質含有量については、試料中の窒素含有量をケルダール法で測定し、窒素／蛋白質換算係数6.38を用いて換算した百分率として表示した。

10 また、ラクトパーオキシダーゼの純度については、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析し、試料中の蛋白質に由来する全ピーク面積に対する、ラクトパーオキシダーゼのピーク面積の百分率として表示した。

本明細書において、上記蛋白質含有量および純度以外の百分率は特に断りのない限り質量による表示である。

15 本発明で用いることのできる乳原料としては、少なくともラクトパーオキシダーゼが含有されていればいかなるものも使用することができる。例えば、ヒト、ウシ、水牛、ヒツジ、ヤギ、ウマ等の哺乳類由来の、乳、脱脂乳、ホエー等を用いることができる。なかでも熱処理条件の緩やかなものや未加熱のものを用いることが好ましい。また、脱脂粉乳、全脂粉乳、ホエー粉、ホエー蛋白質濃縮物（W
20 PC）、ホエー蛋白質分離物（WPI）等を水又は緩衝液に溶解させた溶液も使用できる。さらに、等電点沈澱によってカゼインを除去したり、レンネットによってカゼインを排除した上清、或いはチーズ製造時に排出されるチーズホエーも使用することができる。これらの乳原料は、予めクラリファイヤー、マイクロフ
ィルトレーション、濾過等の操作によって沈澱物を除去しなくても使用できる。

25 本発明において、特に、乳原料としてウシ由来の乳原料を用いてウシラクトパーオキシダーゼを製造することが好ましい。

なお上記乳原料は単独で用いても二種以上を組み合わせ用いても良い。

本発明の製造方法について以下に説明する。

- (1) まず、乳原料を陽イオン交換体に接触させて吸着処理を行う。陽イオン交換体としては、イオン交換基として弱酸性基を有するものが用いられる。弱酸性のイオン交換基としては、イオン交換基としての目的とする働きを有する交換基を任意で選択することができる。弱酸性のイオン交換基の例としては、カルボキシル基、カルボキシメチル基、フェノール基等が挙げられる。好ましくはカルボキシメチル基である。

- 陽イオン交換体は特に限定されず、必要に応じて任意で選択可能である。好ましい陽イオン交換体の例としては、架橋型多糖類(アガロース、デキストラン、セルロース等)、親水性シリカゲル、合成ポリマー等からなる多孔性粒子に弱酸性のイオン交換基を導入したもの等が挙げられる。具体例としては、セパビーズ F P-CM13 (三菱化成社製、交換基:カルボキシメチル基) や、CM-セファデックス C-50 (アマシャム社製、交換基:カルボキシメチル基)、CM-セファロース-FF (アマシャム社製、交換基:カルボキシメチル基) を好適に用いることができる。

- 15 陽イオン交換体の樹脂の形、サイズ、表面状態、材質等は任意であり必要に応じて選択可能である。使用形態の例としては、イオン交換体樹脂が既に充填されたプレパックカラムや、陽イオン交換体の樹脂ビーズをカラム等の媒体に充填したもの等が挙げられる。これらの場合、一種類の陽イオン交換体を1つの媒体と組み合わせて用いる事が簡便性の面から好ましい。しかしながら、必要に応じて
- 20 複数の媒体のそれぞれに樹脂ビーズを詰めたものを直列または並列に接続してクロマトグラフィーを行ってもよい。媒体の形状は必要に応じて選択できるが、洗浄が容易で、かつ含まれる樹脂ビーズ等に多くの接触面を与える形状であることが好ましく、また内壁は凹凸の無い平らな表面であることが好ましい。具体的には円筒形(円柱状、棒状)や円錐状など、円形面を有する形状が媒体の形状として好ましく使用できる。媒体の材質は任意で選択できるが、好ましくはステンレス、ガラス、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、アクリル樹脂等が使用できる。媒体のサイズは、適宜処理スケールによって選択してよく、例えば数立方センチメートルから数立方メートルの規模まで任意に選択できる。本発明に好ましく使用してよい市販のプレパックカ

ラムとしては、Hi p r e p 1 0 / 1 6 C M F F (アマシャム社製、交換基：カルボキシメチル基)、CM-TOYOPEARLPAK650シリーズ(東ソー社製、交換基：カルボキシメチル基)等が挙げられる。

ここで、ラクトパーオキシダーゼの回収率を高めるためには、これより後の工程において、吸着処理後の陽イオン交換体に溶出溶媒を接触させたときに、陽イオン交換体に吸着された蛋白質が容易に脱離されて該溶出溶媒中に溶出することが好ましい。したがって、本発明においては、乳原料中の蛋白質の陽イオン交換体への結合が強すぎない方が好ましい。イオン交換基として強酸性基を有する陽イオン交換体は広いpH範囲でイオン交換基が解離している。これに対して、イオン交換基として弱酸性基を有する陽イオン交換体はpHに依存して電荷が変化する。このため、蛋白質の結合能も変化するという特性を持つので、本発明の製造方法において好適である。なお本発明においてイオン交換基の酸解離定数が3未満のものを強酸性基、及び3以上のもの弱酸性基として定義することができ、強酸性基としてはスルホン酸基、弱酸性基としてはカルボキシメチル基を、それぞれ例示することができる。

また、本発明で用いられる陽イオン交換体の多孔性または吸着性のスケールは任意で選択でき、さらにラクトパーオキシダーゼとほぼ同じ等電点と分子量を有するような蛋白質、具体的には分子量7～9万ダルトン、等電点7～9である蛋白質に対する吸着能を指標として表すことができ、中でもラクトフェリン(分子量:約8万。等電点:約8)に対する吸着能を指標として表すことが好ましい。なお、陽イオン交換体のラクトフェリンに対する吸着能は、例えば特公平6-13560号公報に記載された方法で求めることができる。

すなわち、ナトリウム形の陽イオン交換体を水で膨潤させて10mlとしたものを、未加熱の脱脂乳1kg(pH6.7)中に投入し、これらの混合液を4℃で16時間攪拌した後、陽イオン交換体を分取して水洗する。水洗した陽イオン交換体を濃度10%の食塩水150mlに接触させ、陽イオン交換体から食塩水中にラクトフェリンを溶出させる。この溶出によって得られた回収液中のラクトフェリン含量をローリー法〔アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry)、アメリカ、第15巻、1966年、p. 45～52〕により測

定することによって吸着能（単位：mg／10ml）を算出する。

上記方法で測定されるラクトフェリン吸着能がより高い陽イオン交換体を選択することにより、本発明の方法によるラクトパーオキシダーゼの回収量を高めることができる。すなわち上記方法に従い、未加熱の脱脂乳1kg中に陽イオン交

- 5 換体10mlを投入したときのラクトフェリン吸着能が70mg以上である陽イオン交換体が好ましく、85mg以上である陽イオン交換体がより好ましく、90mg以上である陽イオン交換体がさらに好ましい。該吸着能の値は高い方がより好ましく、一般的に、牛乳1kg中のラクトフェリン含有量は約100mg程度であり、その全量を吸着できる陽イオン交換体が理想的である。具体的に、上記で挙げたセパビーズFP-CM13のラクトフェリン吸着能は85mg／10ml、CM-セファデックスC-50のラクトフェリン吸着能は91mg／10mlであり、いずれも高いラクトフェリン吸着能を示す陽イオン交換体である。

- 15 乳原料と陽イオン交換体との吸着処理（接触）は任意で選択可能である。吸着処理は例えば、バッチ式攪拌法、カラム連続法等の方法で行うことができる。乳原料と陽イオン交換体を十分に接触させることができれば、いずれの処理も実施可能である。1つの処理で行っても、複数の吸着処理を組み合わせても良い。

- 20 バッチ式の場合、一定量の乳原料から多くの収量を望む場合には多くの陽イオン交換体を用い、一定量の陽イオン交換体で多くの収量を望む場合には多くの乳原料を用いることが適当である。バッチ式における乳原料と陽イオン交換体の混合体積比率は、陽イオン交換体の吸着能や具体的な吸着処理方法に応じて任意に調整することができる。

ここで、陽イオン交換体の特性は、硬質タイプと軟質タイプの2つに大きく区分されるが、本発明ではいずれのタイプも使用可能である。

- 25 硬質タイプは、イオン強度またはpHによってイオン交換体自身の体積はほとんど変化せず、また流速の変化などにより陽イオン交換体にかかる圧力が変化しても陽イオン交換体自体の体積はほとんど変わらない。したがって、硬質タイプは、陽イオン交換体をカラム内に保持して高流速で通液するカラム連続法により適している。

一方、軟質タイプの陽イオン交換体はイオン強度またはpHによってイオン交換体自身の体積が大きく変化し、また流速の変化などにより陽イオン交換体にかかる圧力が変化すると陽イオン交換体自体の体積が容易に変化する。そのため、軟質タイプの陽イオン交換体をカラム内に保持して高流速で通液することは困難である。特に脱脂乳やホエー等を通液する時は他の塩類溶液等を通液する時に比べて陽イオン交換体層内で大きな圧力損失が生じる。したがって、軟質タイプの陽イオン交換体は、もっぱらバッチ法に適している。

なお、前記のセパビーズF P-CM13（三菱化成社製）は硬質タイプであり、CM-セファデックスC-50（アマシャム社製）は軟質タイプである。

- 10 乳原料と陽イオン交換体を吸着処理させる温度は、0℃未満では乳原料の凍結や、粘度上昇などが生じる恐れがあり、60℃を超える場合はラクトパーオキシダーゼが変性する可能性があるため、0～60℃の範囲で行われる事が好ましい。なお、25～60℃であっても、吸着に長時間を要する場合等では、ラクトパーオキシダーゼが少しずつ変性していく可能性があることから、特に0～25℃で
- 15 行われることが好ましい。また、未殺菌の乳原料を使用する場合は、細菌の繁殖を防ぐため、0～10℃で実施することが望ましい。

- 乳原料と陽イオン交換体の吸着処理時間（接触時間）については、吸着処理時の温度、採用する吸着処理方式（バッチ式またはカラム連続法）等を勘案して適宜条件を選択することができる。例えば、バッチ式の場合は、乳原料と陽イオン
- 20 交換体の吸着処理時間は1分以上24時間以下が好ましく、10分以上6時間以下がより好ましい。また、カラム連続法の場合は、線流速10cm/h以上1000cm/h以下であることが好ましい。

- （2）次に、吸着処理後の陽イオン交換体を洗浄処理する。このときの洗浄液としては、イオン強度が0.07未満と低い塩類水溶液、又は中性若しくは弱酸性
- 25 領域の緩衝液を用いることも可能であるが、製造コストの面から考慮すると水で洗浄することが好ましい。

吸着処理後の陽イオン交換体については、使用された乳原料をどのような方法で洗浄除去してもよい。たとえば乳原料と陽イオン交換体が入った容器から陽イオン交換体のみを移動して他の場所で洗浄しても良いし、前記容器から乳原料を移

動させてその後陽イオン交換体を容器中で洗浄しても良い。

(3) 次いで、洗浄処理を終えた陽イオン交換体に溶出溶媒を接触させる。これにより、陽イオン交換体から該溶出溶媒中にラクトパーオキシダーゼを溶出させて溶出液を得る。

- 5 この工程で使用する溶出溶媒は、イオン強度が0.07以上0.3以下の範囲のものが好ましく、0.10以上0.25以下の範囲のものがより好ましく、0.15以上0.22以下の範囲のものがさらに好ましい。イオン強度が上記範囲の溶出溶媒を用いることにより、陽イオン交換体からラクトパーオキシダーゼを効率良く溶出させることができる。

- 10 該溶出溶媒としては、イオン強度を上記の範囲に調整した中性又は弱酸性領域の緩衝液を用いることもできる。しかしながら、製造コストの面から考慮すると塩類のみを溶解した水溶液（塩類溶液）を用いることがより好ましい。本願で利用できる塩類は必要に応じて一種あるいは二種以上の組合せを任意で選択可能である。

- 15 好ましい塩類溶液は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、および塩化マグネシウム等からなる群から選ばれる1種又は2種以上の混合物からなる塩類の水溶液である。

(4) 次に、得られた溶出液に対して、限外濾過膜を用いた膜分離法によって膜処理を行う。これによって溶出液を濃縮し、該溶出液中に沈澱を生成させる。

- 20 限外濾過膜の運転方法は、水および分画分子量以下の分子量を有する成分を透過させて除去する通常の限外濾過法と、膜を透過した透過液と等量の水を、膜上の保持液に添加しながら連続運転する流水濾過法（ダイアフィルトレーション）の2つに区分されるが、本発明においてはいずれの方法も使用できる。特に、後者の流水濾過法は、濃縮と同時に脱塩処理を行うことができるとともに、保持液
25 からの低分子量成分を高度に除去できる点でより好ましい。

なお、前者の通常の限外濾過法を用いた場合には、限外濾過の後に、透析やゲル濾過等の方法で脱塩処理を行うことが好ましい。

限外濾過膜は、一般に市販されている限外濾過膜であれば何れも使用できる。具体例としては、IRIS 3038膜およびIRIS 3072膜（いずれもロー

ヌ・プーラン社製)、あるいはGR-61pp膜(DDS社製)などが挙げられる。

限外濾過膜の材質は有機材料製又は無機材料製の何れであっても使用可能であり、コスト面、汎用性等を考慮して選択すればよい。

- 5 限外濾過処理時の溶出液の温度は、使用する膜の耐熱温度以下であれば(例えばGR-61pp膜なら80℃以下)実施可能である。ただし60℃以上ではラクトパーオキシダーゼが熱変性する可能性があり、また10~60℃の範囲では微生物の繁殖が著しいことから、0~10℃の範囲で行うことが好ましい。

- 10 限外濾過時の圧力は、使用する膜の耐圧限界以下であれば(例えばGR-61pp膜なら0.6MPa以下)いずれの圧力でも可能である。尚、耐圧限界値付近での使用は膜の寿命を縮める可能性があるため、耐圧限界の2/3以下(例えばGR-61pp膜なら0.4MPa以下)で行うことが好ましい。

- 15 使用する限外濾過膜モジュールは、管型、中空糸型、平膜型、スパイラル型などいずれの形式でも可能である。ただし、中空糸型内圧式等のモジュールでは、中空糸内に沈澱物が生成した場合に流路閉塞を起こす可能性があるため、圧力等を考慮して行うことが好ましい。

- 20 前段の(3)工程において得られる溶出液は、茶色の清澄な溶液であることが好ましい。そして、この溶出液に対して限外濾過膜による濃縮を行うと、蛋白質の溶解性の違いから、限外濾過膜上の保持液中において、ラクトパーオキシダーゼ以外の蛋白質が沈澱を形成する。ここで、ラクトパーオキシダーゼ以外の蛋白質、すなわち、不純物としての蛋白質を効率良く沈澱させるためには、濃縮後の溶出液中における蛋白質含有量が0.9%以上となるように濃縮することが好ましい。尚、溶出液中における蛋白質含有量が15%を越えると溶出液の粘性が上昇し、限外濾過膜処理の効率が低下する恐れがあることから、濃縮後の溶出液の蛋白質含有量は0.9~15%の範囲内であることがより好ましく、1.5~12%であることがさらに好ましく、3~10%であることが最も好ましい。

沈澱を生成させるまでの各工程の条件等を整えることにより、沈澱中に混入するラクトパーオキシダーゼの量を低減させることができ、ラクトパーオキシダーゼを全く含まない沈澱を生成させることも可能である。

(5) 次に、沈澱が生成した溶出液（保持液）から沈澱を除去する。これにより溶出液から不純物としての蛋白質を除去して、高純度のラクトパーオキシダーゼを含有する溶液（ラクトパーオキシダーゼ溶液）を得る。

5 沈澱の除去方法は任意で選択できる。沈澱が生成した溶出液（保持液）を静置して沈澱物を回収する方法でもよく、あるいは遠心分離や、精密濾過（マイクロフィльтраーション）等による清澄化処理を行うことによって、沈澱物が除去された清澄化処理液（ラクトパーオキシダーゼ溶液）を回収する方法でもよい。

この工程で得られたラクトパーオキシダーゼ溶液は、必要に応じて殺菌処理を行うことが好ましい。その際、ラクトパーオキシダーゼの熱安定性を高めるとい
10 う観点から、塩化カルシウムなどのカルシウムイオンを20 mM程度の濃度になるように添加し、72℃で、15～90秒程度の時間、加熱殺菌することにより殺菌処理を行うことが好ましい。

(6) この後、得られたラクトパーオキシダーゼ溶液の溶媒を除去することにより固体状のラクトパーオキシダーゼを得ることができる。

15 溶媒を除去する方法は、特に限定されず必要に応じて選択できる。例えば限外濾過膜を用いてさらに濃縮した後、常法により凍結乾燥して水分を除去する方法を好適に用いることができる。これにより高純度のラクトパーオキシダーゼ粉末を製造することができる。

このようにして得られる固体状のラクトパーオキシダーゼは、純度80%以上の
20 の高純度を達成することができる。

なお、(6) 溶媒を除去する工程は必須ではなく、高純度ラクトパーオキシダーゼとして、(5) 工程で得られたラクトパーオキシダーゼ溶液を溶液の状態で用いることもできる。

実施例

25 次に試験例を示して本発明を詳細に説明する。ただし、本発明は以下の各実施例に限定されるものではない。例えば本願においてはこれら実施例の構成要素および実施例に含まれない構成要素同士を適宜組み合わせてもよい。また特に断りのない限り上記蛋白質含有量および純度以外において、%は質量%を表す。

[試験例1]

本試験では、工程（１）～（３）に続く、弱酸性陽イオン交換体から回収した溶出液を限外濾過膜で濃縮し、沈澱を生成させる（４）工程において、濃縮液中で沈澱を生成するのに好ましい条件を検討するために行った。

（１）試料

- 5 弱酸性陽イオン交換体として、カルボキシメチル基を有し、ラクトフェリン吸着能が $91 \text{ mg} / 10 \text{ ml}$ である CM-セファデックス C-50（アマシャム社製）を用いた。

10 該弱酸性陽イオン交換体 170 ml を充填したカラムに、脱脂乳 20 リットル を添加することにより、交換体に蛋白質を吸着させた。次いで、カラム内の弱酸性陽イオン交換体を水洗した後、カラム内に溶出溶媒として 1.6% 食塩水（イオン強度 0.27 ） 200 ml を添加することにより、弱酸性陽イオン交換体に吸着された蛋白質を該食塩水中に溶出させた。回収した約 200 ml の溶出液を試験試料とした。尚、得られた試験試料中の蛋白質含有量をケルダール法によって測定したところ、 0.26% であった。

15 （２）試験方法

3種の遠心分離式限外濾過フィルターユニット（分画分子量： 1 万ダルトン 、 3 万ダルトン 、及び 5 万ダルトン 。いずれもミリポア社製）を用意した。

20 それぞれのフィルターユニットに試験試料 0.5 ml を添加し、毎分 $6,000$ 回転で遠心分離して限外濾過を行い、沈澱生成の有無を観察した。その際、遠心分離の時間をコントロールすることによって、フィルターユニット内の保持液の体積を段階的に変化させた。

（３）試験結果

25 本試験の結果、分画分子量が異なる3種のフィルターユニットのいずれにおいても、フィルターユニット内の保持液の体積が 0.15 ml に濃縮された場合に、フィルターの上に白色の沈澱が観察された。保持液の体積が 0.15 ml 以下の場合にも沈澱の生成が観察されたが、 0.15 ml 以上では沈澱の生成は全く観察されなかった。

また、保持液の体積が 0.15 ml に濃縮されたときの、該保持液中における全蛋白質含有量は 0.9% であった。

このことから、濃縮後の保持液の全蛋白質含有量が0.9%以上となるように濃縮すると、保持液中に沈澱が生成されることが認められた。

[試験例2]

本試験は、限外濾過膜を用いた濃縮によって生成された沈澱の溶解性に及ぼす

5 脱塩処理の影響を検討するために行った。

(1) 試料

本試験の試料は、試験例1と同様の試験試料(1.6%食塩水に蛋白質を溶出させた溶出液、蛋白質含有量:0.26%)を使用した。

(2) 試験方法

10 分画分子量3万ダルトンの限外濾過膜を装着した攪拌式セルユニット(ミリボア社製)を3つ用意し、それぞれのセルユニットに試験試料50mlを添加した。窒素ガスを用いて、セルユニット内が約0.3MPaとなるように加圧し、セルユニット内の該保持液が10mlになるまで濃縮した。

15 一つ目のセルは、保持液が10mlになったところで、セルユニット内の保持液全量を遠心チューブに移し、毎分10,000回転で遠心分離することによって固液分離し、沈澱(沈澱試料1)を回収した。

二つ目のセルは、保持液が10mlになったところで、セルユニット内の保持液全量を遠心チューブに移し、毎分10,000回転で遠心分離することによって固液分離し、沈澱を回収した。この沈澱に10mlの精製水を添加し、ボルテックスミキサーで1分間攪拌した。こうして得られた沈澱懸濁液を遠心チューブに移し、さらに毎分10,000回転で遠心分離することによって固液分離し、沈澱(沈澱試料2)を回収した。

20 三つ目のセルは、保持液が10mlになるまで濃縮されたセルユニット内に、精製水40mlを添加し、前回と同様に加圧しながら、再び保持液が10mlになるまで濃縮した。保持液が10mlになったところで、このセルユニット中の保持液全量を遠心チューブに移し、毎分10,000回転で遠心分離することによって固液分離し、沈澱(沈澱試料3)を回収した。

沈澱試料1~3の乾燥重量を常法により測定した。

(3) 試験結果

本試験の結果、いずれのセルにおいても、セルユニット内の保持液が10mlになった状態で保持液中には沈澱が形成されていた。

また、沈澱試料1、沈澱試料2、および沈澱試料3の質量に殆ど差は無かった。したがって、濃縮工程により一旦生成された沈澱に精製水を添加しても、沈澱は再溶解しないことが確認された。

また、溶出液中で一旦生成された沈澱は、脱塩処理により塩濃度が変化してもその影響を受けず、沈澱は再溶解しないことが認められた。

次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

10 (実施例1)

弱酸性陽イオン交換体として、カルボキシメチル基を有し、ラクトフェリン吸着能が91mg/10mlであるCM-セファデックスC-50（アマシャム社製）を用意した。

この陽イオン交換体17リットルを内径50cmのカラムに充填し、該カラムに1.5%食塩水40リットルを通液した後、水洗してカラム内の陽イオン交換体をナトリウム形に調製した。

乳原料としてウシ由来の脱脂乳（pH6.7、後述の試料1）を用意した。この脱脂乳2000リットルを温度4℃、流速60リットル/hの条件で上記カラムに通液して吸着処理を行った。

20 吸着処理後のカラムに水を通液して、陽イオン交換体に非特異的に吸着した乳成分を洗浄処理した。

次いで、溶出溶媒として1.6%食塩水（イオン強度0.27）20リットルを30リットル/hの流速で通液し、陽イオン交換体に吸着した蛋白質の溶出処理を行った。これにより、ウシラクトパーオキシダーゼを含む溶出液（後述の試料2）21リットルを回収した。

次に、溶出液21リットルを分画分子量2万の限外濾過膜（DD S社製）ユニットを用いて平均圧力0.3MPaで限外濾過し、保持液量が2リットルになるまで濃縮を行った。

この後、水を添加しながらさらに限外濾過することにより保持液を脱塩処理し、

最終的に 2 リットルの保持液を回収した。保持液中には白色の沈澱が生成していた。

次いで、白色の沈澱を含む保持液を静置して清澄化し、上清画分（後述の試料 3） 1. 9 5 リットルをウシラクトパーオキシダーゼ溶液として回収した。

- 5 回収した上清画分（ウシラクトパーオキシダーゼ溶液）に対して、ポアサイズ 1. 4 μ m の精密濾過膜を用いたマイクロフィルトレーションを行って、さらに微量の沈澱物を除去し、ウシラクトパーオキシダーゼを含む精製標品を製造した。

さらに、得られた精製標品を凍結乾燥し、ウシラクトパーオキシダーゼを含む粉末状の凍結乾燥標品（後述の試料 4） 2 6 g を製造した。

- 10 製造工程中に得られた前記試料 1 ～ 4、すなわち脱脂乳（乳原料）：試料 1、陽イオン交換体からの溶出液：試料 2、限外濾過膜処理後の保持液の上清画分：試料 3、凍結乾燥標品：試料 4 について、それぞれ蛋白質含有量及びウシラクトパーオキシダーゼ活性を測定し、比活性を求めた。ここで、蛋白質含有量はケルダール法により測定し、ウシラクトパーオキシダーゼ活性はピュッターらの方法
- 15 [バーグマイヤー (Bergmeyer) 編、メソッズ・オブ・エンザイマチック・アナリシス (Methods of Enzymatic Analysis) 第 3 版、第 3 巻、1 9 8 3 年、p. 2 8 6 ～ 2 9 3] で測定し、蛋白質 1 m g 当たりのパーオキシダーゼ活性（比活性）を求めた。その結果を表 1 に示す。

表 1

試料	蛋白質含有量(%)	比活性(unit/mg)
試料 1	3.30 ^a	0.2
試料 2	0.26	132.5
試料 3	1.64	220.3
試料 4	92.30	224.4

表 1 に示すように、試料 1 の蛋白質含有量は 3.30% であり、比活性は 0.20 unit/mg であった。また、試料 2 の蛋白質含有量は 0.26%、比活性は 132.5 unit/mg であった。これらの結果より、脱脂乳（乳原料）中の蛋白質のうち、ウシラクトパーオキシダーゼが選択的に溶出液中に溶出されたことがわかる。

また、試料 3 の蛋白質含有量は 1.64%、比活性は 220.3 unit/mg であり、試料 4 の比活性は 224.4 unit/mg であった。

10 試料 2 と試料 3, 4 の結果を比較すると、溶出液を限外濾過膜を用いて濃縮し、生成した沈澱物を除去することによって、ウシラクトパーオキシダーゼの比活性が格段に高まっている。このことから、かかる沈澱物の除去によりウシラクトパーオキシダーゼ以外の不純物としての蛋白質が効果的に除去され、ウシラクトパーオキシダーゼの精製効率が向上していることがわかる。

15 また、前記試料 4（凍結乾燥標品）について、ラクトパーオキシダーゼの純度を高速液体クロマトグラフィーにて分析した。

この分析には、Shodex Asahipak C4P-50 カラム、および測定波長 280 nm の紫外吸収検出器を装備した HPLC 装置を用いた。移動相は、流速 0.8 ml/min であり、A 液（トリフルオロ酢酸 0.03% を含む、アセトニトリル：0.5M 塩化ナトリウム = 10 : 90 の混合液）および B 液（トリフルオロ酢酸 0.03% を含む、アセトニトリル：0.5M 塩化ナトリウム = 50 : 50 の混

合液) について、30分間で $A : B = 50 : 50 \rightarrow A : B = 0 : 100$ の濃度変化とする直線濃度勾配法により溶出を行った。試料は約20mg秤量し、2.9%塩化ナトリウム水溶液10mlに溶解して、その25 μ lを前記分析方法にて試験した。

- 5 ここで、予め標準品として精製ウシラクトパーオキシダーゼ（シグマ社製）を使用し、前記分析方法で標準品のピークが溶出時間約18分であることを確認した。

続いて、前記分析方法で試料4を分析し、ウシラクトパーオキシダーゼ純度をピーク面積の自動積分法により測定した。

- 10 その結果、試料4のウシラクトパーオキシダーゼ純度は89%であることが確認された。したがって、本発明の方法により、乳原料から高純度にラクトパーオキシダーゼを製造できることが確認された。

産業上の利用の可能性

- 15 本発明は、従来より簡単な工程で、より短時間に、より低コストで、純度の高いラクトパーオキシダーゼを製造することができ、また工業的規模での製造にも適用することができるラクトパーオキシダーゼの製造方法を提供する。

請求の範囲

1. (1) イオン交換基として弱酸性基を有する陽イオン交換体に乳原料を接触させて吸着処理する工程、(2) 前記吸着処理の後の陽イオン交換体を洗浄処理する工程、(3) 前記洗浄処理された陽イオン交換体にラクトパーオキシダーゼを溶出させる溶出溶媒を接触させ、該溶出溶媒中にラクトパーオキシダーゼが溶出された溶出液を得る工程、(4) 前記溶出液を限外濾過膜で濃縮することにより、濃縮された溶出液中に沈澱を生成させる工程、および(5) 前記濃縮された溶出液から沈澱を除去してラクトパーオキシダーゼ溶液を得る工程、とを有するラクトパーオキシダーゼの製造方法。
2. 前記陽イオン交換体におけるラクトフェリン吸着能が $85 \text{ mg} / 10 \text{ ml}$ 以上である、請求項 1 に記載のラクトパーオキシダーゼの製造方法。
3. 前記イオン交換基がカルボキシメチル基である、請求項 1 または 2 に記載のラクトパーオキシダーゼの製造方法。
4. 前記(4) 工程において、前記濃縮された溶出液中の蛋白質含有量が $0.9 \sim 15\%$ となるように濃縮して沈澱を生成させる、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のラクトパーオキシダーゼの製造方法。
5. 前記(3) 工程で用いる溶出溶媒のイオン強度が $0.07 \sim 0.3$ である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のラクトパーオキシダーゼの製造方法。
6. 前記(3) 工程で用いる溶出溶媒が、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、および塩化マグネシウムからなる塩類群から選ばれる少なくとも一種を含む水溶液である、請求項 5 に記載のラクトパーオキシダーゼの製造方法。
7. さらに、前記(5) 工程で得られるラクトパーオキシダーゼ溶液の溶媒を

除去することにより固体状のラクトパーオキシダーゼを得る工程を有する、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のラクトパーオキシダーゼの製造方法。

8. 固体状のラクトパーオキシダーゼの純度が 80 % 以上である、請求項 7 に
- 5 記載のラクトパーオキシダーゼの製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002356

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N9/04, B01D15/04, 61/14, B01J39/04, 49/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N9/04, B01D15/04, 61/14, B01J39/04, 49/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 5-202098 A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 10 August, 1993 (10.08.93), & US 5516675 A & EP 0556083 A1	1-8
A	JP 3-502921 A (Svenska Mejeriernas Riksforenings Ekonomi-AB.), 04 July, 1991 (04.07.91), & US 5149647 A & EP 0390821 A1	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25 May, 2005 (25.05.05)

Date of mailing of the international search report
10 May, 2005 (10.05.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N9/04, B01D15/04, 61/14, B01J39/04, 49/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N9/04, B01D15/04, 61/14, B01J39/04, 49/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 5-202098 A (雪印乳業株式会社) 1993. 08. 10 & US 5516675 A & EP 0556083 A1	1-8
A	JP 3-502921 A (スベンスカ、メジェリールナス、リクスフェレニン グス、エコノミーアクチュボラッグ) 1991. 07. 04 & US 5149647 A & EP 0390821 A1	1-8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 05. 2005

国際調査報告の発送日

10. 05. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3540